



耐熱性紅色光合成細菌の循環的電子伝達に関するタンパク質の機能解明

著者	齊藤 貴之
号	51
学位授与番号	3687
URL	http://hdl.handle.net/10097/37355

氏 名	さいとう たか ゆき 齊 藤 貴 之		
授 与 学 位	博士 (工学)		
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 9 月 13 日		
学 位 授 与 の 根 拠 法 規	学位規則第 4 条第 1 項		
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院工学研究科 (博士課程) 生物工学専攻		
学 位 論 文 題 目	耐熱性紅色光合成細菌の循環的電子伝達に關与する タンパク質の機能解明		
指 導 教 員	東北大学教授 熊谷 泉		
論 文 審 査 委 員	主査 東北大学教授 熊谷 泉	東北大学教授 猪股 宏	
	東北大学教授 末永 智一	教授 野澤 庸則	
	(独立行政法人 大学評価・学位授与機構)		

論文内容要旨

第1章 序論

光合成明反応は、光エネルギーを電気化学エネルギーへと変換する反応である。明反応におけるエネルギー変換は高効率の光誘起電子伝達により行われ、その機能を担う器官が循環的電子伝達鎖である。循環的電子伝達鎖を構成するタンパク質は、反応中心、シトクロム bc_1 複合体、可溶性電子伝達体であり、それぞれ特徴的な機能を持つ。これらをエネルギー変換システムとして人工的に再構築すれば無尽蔵の光エネルギーの有効利用が可能となるだけでなく、個々でも光に関わる素子としての利用が期待できる。しかしながら、タンパク質を工学的に利用する場合、熱変性のため適用温度範囲が狭くなることも少なくない。そのため、タンパク質の構造や機能を維持した有効利用が望まれる。そこで本研究では、光エネルギー変換システムの人工的再構築に向け、熱安定性のある耐熱性紅色光合成細菌 *Thermochromatium(Tch.) tepidum* の循環的電子伝達鎖を構成するタンパク質を個々に単離し、分光学・電気化学的にその機能を明らかにすることを目的とした。

第2章 反応中心スペシャルペア、結合性シトクロムの酸化還元挙動

反応中心は、光エネルギーの吸収により電子伝達を引き起こすため、循環的電子伝達鎖の中で最も重要な器官である。反応中心内部には、電子伝達を行う様々な色素が存在する。光エネルギーは色素 (スペシャルペア) の励起エネルギーとして吸収され、励起された電子を放出する。光酸化されたスペシャルペアは、結合性シトクロム内に存在する4つのヘム ($H_1 \sim H_4$) により還元され、再び光エネルギーの吸収が可能となる。本章では、タンパク質用に開発した薄層電気化学セルを用いて、反応中心のスペシャルペアおよび結合性シトクロム内ヘムの酸化還元挙動を測定し、スペシャルペア還元経路について考察した。

Tch. tepidum の反応中心は、結合性シトクロムが容易に脱離するため、結合性シトクロムを持つ反応中心 (+CytRC) と持たない反応中心 (-CytRC) が存在する。電気化学測定よりスペシャルペアの吸収波長と酸化還元電位は、+CytRC と -CytRC でそれぞれ 885 nm、497 mV および 875 nm、525 mV と決定された。この差異は、結合性シトクロムの有無により、スペシャルペア近傍の相互作用が変化したためと推測される。また結合性シトクロム内のヘムの吸収波長と酸化還元電位は、低電位ヘム (H_1 , H_2) および高電位ヘム (H_3 , H_4) で、それぞれ 552

nm、18 mV および 556 nm、384 mV と決定され、どちらのヘムもそれぞれ 2 つのヘムの吸収波長と酸化還元電位は同一であった。求められた酸化還元電位から、低電位ヘム、高電位ヘムどちらもスペシャルペアを還元できるため、スペシャルペア還元には 2 経路存在することが予測された。

第 3 章 反応中心における光誘起電子移動

第 2 章においてスペシャルペア還元経路が予測されたことから、本章では実際にスペシャルペア還元を経時観測し、その経路と電子伝達速度（時定数）の決定を目的とした。

スペシャルペア吸収の時間分解スペクトルの解析により、溶液電位が高い場合、高電位ヘム H_4 からスペシャルペアおよび高電位ヘム間 (H_3-H_4) の電子伝達が観測され、それぞれの時定数は 500 ns、30 μ s と決定された。またこれら 2 つの成分がスペシャルペア還元を支配する割合は、溶液電位の影響を受けていた (図 1)。また、ネルンストの式を利用した解析により、高電位ヘムの酸化還元電位は H_3 379 mV、 H_4 380 mV と決定され、第 2 章の測定結果と一致した。一方、溶液電位が低い場合、スペシャルペアは高電位ヘム H_4 以外に低電位ヘム H_2 でも還元され、その時定数は 30 ns 以下と決定された。よって、第 2 章の予測通りスペシャルペアは高電位ヘム H_4 と低電位ヘム H_2 の 2 つのヘムにより還元されることがわかった。

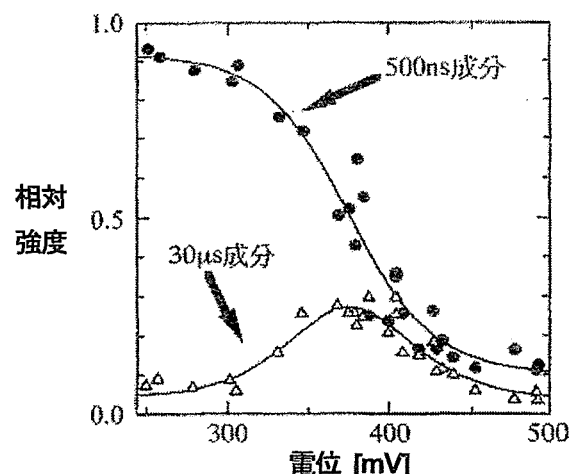


図 1 溶液電位によるスペシャルペア還元を行う成分の強度変化

第 4 章 シトクロム bc_1 複合体の分光特性と酸化還元挙動

シトクロム bc_1 複合体は、反応中心からの電子伝達により H^+ 濃度勾配を形成する機能を持つ重要なタンパク質である。エネルギー変換システムを人工的に再構築するには反応中心と同様に必須のタンパク質であるが、*Tch. tepidum* では未だシトクロム bc_1 複合体が単離されていない。そこで本章では、*Tch. tepidum* のシトクロム bc_1 複合体の単離方法の確立とその分光特性と酸化還元挙動の解析を目的とした。

非イオン性界面活性剤 n-Dodecyl- β -D-maltoside を用いた可溶化と DEAE 陰イオン交換クロマトグラフィーにより、シトクロム bc_1 複合体の単離・精製に成功した。シトクロム bc_1 複合体のサブユニットは、主要サブユニットとしてシトクロム c_1 34 kDa、シトクロム b 48 kDa、高電位鉄イオウタンパク質 20 kDa、その他色素を含有しない 15 kDa と 70 kDa のサブユニットが同定された。つづいて酸化還元剤添加時の UV 測定を行い、各々の UV スペクトルの差スペクトルから色素の同定を行った (図 2)。

(アスコルビン酸還元 (ASC) - フェリシアン化カリウム酸化 (FeCN)) の差スペクトルでは、552 nm にピークが現れた。フェリシアン化カリウム酸化では全てのヘムが酸化状態であるが、アスコルビン酸還元ではヘム c_1 のみ還元

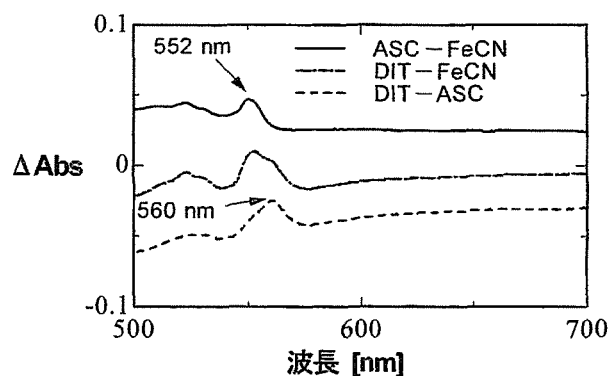


図 2 各々の酸化還元状態間の UV 差スペクトル

され2つのヘム*b*は酸化状態である。したがって、それらの差スペクトルでは酸化還元状態の異なるヘム*c*₁のピークが現れる。よって、552 nmの吸収はヘム*c*₁と帰属した。一方、(ハイドロサルファイト還元 (DIT) –アスコルビン酸還元 (ASC))の差スペクトルでは、ヘム*b*のみ酸化還元状態が異なるため、560 nmの吸収はヘム*b*と帰属した。また、MCD スペクトルの測定から、シトクロム *bc*₁ 複合体の3つのヘムは全て低スピンヘムであることがわかった。さらに、MCD スペクトル解析により各ヘムの酸化還元電位は、ヘム*c*₁ 96 mV、ヘム*b* –60 mVと予測された。

第5章 可溶性電子伝達体の性質と機能

可溶性電子伝達体は、シトクロム *bc*₁ 複合体から反応中心へ電子を伝達する可溶性の低分子量タンパク質である。可溶性電子伝達体は、反応中心やシトクロム *bc*₁ 複合体のように高度に組織化された機能を持たないが、反応中心へ電子を戻すことで循環的電子伝達を完了させられる。そのため、エネルギー変換システムを再構築するには必須のタンパク質であるが、*Tch. tepidum* では未だ明反応の可溶性電子伝達体が同定されていない。そこで本章では、*Tch. tepidum* から可溶性電子伝達体を単離し、その分光・電子化学的性質を明らかにし、反応中心への電子伝達測定から明反応の可溶性電子伝達体を明らかにすることを目的とした。

DEAE 陰イオン交換クロマトグラフィーにより可溶性電子伝達体の単離・精製に成功した。単離された可溶性電子伝達体は4種であり、HiPIP (高電位鉄イオウタンパク質)、シトクロム *c'*、フラボシトクロム *c*、低電位シトクロム *c*552 と同定した。HiPIP とシトクロム *c'* は、単一サブユニットの低分子量タンパク質であり、それぞれ分子量と酸化還元電位は、12 kDa、340 mV および 15 kDa、100 mV と決定した。フラボシトクロム *c* は、分子量 42 kDa の FAD 結合型サブユニットと 20 kDa のシトクロムサブユニットにより構成され、シトクロムにはヘムが2つ存在し、それぞれ酸化還元電位は–15、85 mV と決定した。低電位シトクロム *c*552 は、分子量 45 kDa、酸化還元電位–15 mV と決定されたが、タンパク質内には複数のヘムの存在が示唆された。

各可溶性電子伝達体と反応中心との電子伝達測定では、HiPIP のみ電子伝達が起こったことから明反応の可溶性電子伝達体はHiPIPであることがわかった。また電子伝達の時間分解スペクトル解析から、HiPIP-反応中心ヘム間の電子伝達の時定数を 52 ms と決定した (図3)。

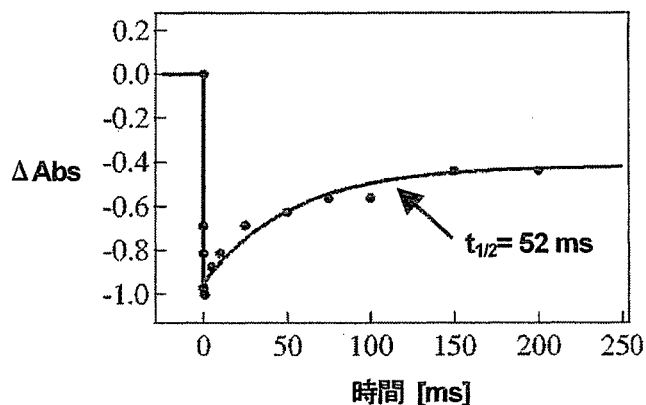


図3 HiPIP-反応中心間の電子伝達の時間分解スペクトル

第6章 総括

本研究では、光エネルギー変換システムの人工的再構築に向け、耐熱性紅色光合成細菌 *Thermochromatium tepidum* の循環的電子伝達鎖を構成するタンパク質 (反応中心、シトクロム *bc*₁ 複合体、可溶性電子伝達体) について、個々のタンパク質の単離・精製に成功し、分光・電気化学的にその機能を明らかにした。今後、実際にエネルギー変換機能を発現させるためには、反応中心やシトクロム *bc*₁ 複合体の配向を制御し、膜内へ再構築する必要があり、その導入技術の確立が望まれる。

論文審査結果の要旨

光合成明反応は、光エネルギーを電気化学エネルギーへと変換する反応である。光エネルギー変換反応を担う器官が循環的電子伝達鎖であり、反応中心、シトクロム bc_1 複合体、可溶性電子伝達体により構成される。循環的電子伝達鎖を単離し、その機能の解明が可能となれば、光エネルギー変換システムとして人工的に再構築することにより無尽蔵の光エネルギーの有効利用が可能となるだけでなく、個々でも光に関わる素子としての利用が期待できる。しかしながら、タンパク質を工学的に利用する場合、熱変性のため適用温度範囲が狭くなることも少なくない。そのため、タンパク質の構造や機能を維持した有効利用が望まれる。本論文では、光エネルギー変換システムの人工的再構築に向け、熱安定性のある耐熱性紅色光合成細菌 *Thermochromatium(Tch.) tepidum* の循環的電子伝達鎖を構成するタンパク質を個々に単離し、分光・電気化学的にその機能を明らかにすることを目的として研究を行った結果をまとめたものであり、全編 6 章よりなる。

第 1 章では、本研究を行う上での背景および意義・目的について述べている。

第 2 章では、反応中心内色素の酸化還元挙動について述べている。*Tch. tepidum* の反応中心には結合性シトクロムを持つものと持たないものが存在する。新たに開発したタンパク質用の薄層電気化学セルによる電気化学測定の結果、それぞれの反応中心において、光エネルギーを最初に捉える色素であるスペシャルペアの酸化還元電位が大きく異なることを明らかにし、タンパク質内部の相互作用の違いが色素の物性に影響を与えることが示された。さらに、スペシャルペア還元を行う色素である結合性シトクロム内の 4 つのヘムの吸収波長と酸化還元電位を決定し、スペシャルペア還元の経路が予測された。

第 3 章では、第 2 章で決定した色素の酸化還元電位をもとに行ったスペシャルペア還元の電子伝達について述べている。スペシャルペア還元は、予測されていた通り 2 つの経路で行われることが明らかにされ、それぞれの電子伝達速度が決定された。また溶液電位を変化させた際の電子伝達からヘムの酸化還元電位を算出し、電気化学測定の結果と同一であることが示された。

第 4 章では、シトクロム bc_1 複合体の単離方法の確立およびその分光特性と酸化還元挙動について述べている。非イオン性界面活性剤 n -ドデシル- β -D-マルトシドを用いた可溶化と DEAE 陰イオン交換クロマトグラフィーにより、*Tch. tepidum* のシトクロム bc_1 複合体の単離・精製に初めて成功した。またシトクロム bc_1 複合体のサブユニット構造と複合体中のヘムの電子構造が明らかにされた。さらに磁気円偏光二色性スペクトル解析において、実測スペクトルは標準スペクトルで良好に再現できることが示され、3 つのヘムの酸化還元電位が予測された。

第 5 章では、可溶性電子伝達体の単離方法の確立とその性質・機能について述べている。DEAE 陰イオン交換クロマトグラフィーにより、*Tch. tepidum* の可溶性電子伝達体の単離・精製に成功し、4 つのタンパク質が同定された。また個々のタンパク質の構造および分光・電気化学的性質が明らかにされ、さらに反応中心との電子伝達測定から、*Tch. tepidum* の明反応の可溶性電子伝達体は高電位鉄イオウタンパク質 (HiPIP) であることが示された。

第 6 章では、以上を総括している。

以上要するに本論文では、耐熱性紅色光合成細菌の循環的電子伝達鎖を構成するタンパク質について、これまで単離されていた反応中心以外にシトクロム bc_1 複合体・可溶性電子伝達体に関しては初めて個々に単離し、その分光・電気化学的性質を明らかにしており、本論文でまとめられた成果は光エネルギー変換システムの人工的再構築に向け有益な知見を与えるものであり、生物工学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。